AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM PERIODONTITE E DIABETES MELLITUS TIPO 2

Rafaela Mota de Sousa, Maria Leticia Lança, Carina Alexandra Salas Gonzales, Estela Kaminagakura Tango, Emanuel da Silva Rovai.

Universidade Estadual Paulista, Avenida José Longo, 777 - Centro - 12245-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, rafaela.sousa@unesp.br.; maria.lanaa@unesp.br; carina.salas@unesp.br; estela.tango@unesp.br; ;emanuel.rovai@unesp.br.

Resumo

A periodontite e o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) apresentam relação bidirecional mediada por mecanismos inflamatórios e imunometabólicos. Este estudo avaliou os níveis salivares de caspase-3, caspase-8, HMGB1 e calreticulina e sua associação com parâmetros periodontais e controle glicêmico. Foram avaliados 40 indivíduos com periodontite associada ao DM2, DM2 sem periodontite, periodontite sem DM2 e saudáveis. Analisaram-se parâmetros periodontais, hemoglobina glicada e concentrações salivares dos biomarcadores por ELISA. Os indivíduos com periodontite apresentaram maiores valores nos parâmetros periodontais. HMGB1 e calreticulina apresentaram grandes tamanhos de efeito e poder estatístico superior a 95%, enquanto caspase-3 e caspase-8 apresentaram pequenos efeitos e baixo poder. Os resultados preliminares indicam maior potencial de HMGB1 e calreticulina na investigação dos mecanismos envolvidos na relação entre periodontite e DM2.

Palavras-chave: Periodontite. Diabetes mellitus tipo 2. Biomarcadores. HMGB1. Caspases.

Área do conhecimento: Ciências da Saúde - Odontologia

Introdução

A periodontite é uma doença inflamatória crônica multifatorial, caracterizada pela destruição progressiva dos tecidos de suporte dental: cemento, ligamento periodontal e osso alveolar, resultante da interação entre o biofilme disbiótico e uma resposta imune inflamatória desregulada do hospedeiro (Papapanou et al., 2018; Bartold & Van Dyke, 2017). Patógenos-chave, como *Porphyromonas gingivalis*, empregam estratégias de subversão da imunidade inata do hospedeiro, favorecendo a disbiose do biofilme subgengival e a cronicidade de um estado inflamatório desequilibrado (Hajishengallis, 2015; Hajishengallis et al., 2020; Hajishengallis & Diaz, 2020). Estima-se que a doença afete aproximadamente 50% da população adulta mundial, sendo 10% dos indivíduos apresentando formas severas (Eke et al., 2016; 2020). Dentre os fatores de risco sistêmicos
mais bem estabelecidos na literatura destacam-se o diabetes mellitus (DM), o tabagismo, a obesidade e as doenças cardiovasculares (Borgnakke et al., 2013).

O DM é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crônica, decorrente de defeitos na secreção e/ou ação da insulina, sendo o DM tipo 2 o responsável por mais de 85% dos casos (American Diabetes Association, 2020; Zhang et al., 2024). A doença periodontal é reconhecida como a sexta principal complicação do DM, e evidências provenientes de estudos epidemiológicos demonstram que indivíduos diabéticos apresentam maior prevalência, severidade e progressão da periodontite, incluindo maior perda óssea alveolar e maior perda dental ao longo do tempo (Lalla et al., 2006; Bandyopadhyay et al., 2010; Nibali et al., 2022). Ademais, estudos complementares indicam que o tratamento periodontal está associado à redução da hemoglobina glicada e ao menor risco de complicações do DM tipo 2, evidenciando uma relação bidirecional consagrada entre as duas condições (Sanz et al., 2018; Simpson et al., 2022). Os mecanismos biológicos subjacentes a essa associação envolvem um estado inflamatório sistêmico crônico de baixo grau, compartilhado por ambas as doenças. Destacam-se o aumento na produção de mediadores inflamatórios como interleucina-1β

(IL-1β); fator de necrose tumoral alfa (TNF-α); interleucina-6 (IL-6); interleucina-17 (IL-17); alterações na via RANKL/osteoprotegerina (OPG), favorecendo a reabsorção óssea, estresse oxidativo, formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs), além de disfunções na quimiotaxia e atividade neutrofílicas (Sanz et al., 2018; Nibali et al., 2022).

Dada a relevância da periodontite e do diabetes mellitus tipo 2 como condições crônicas de elevada prevalência e impacto na saúde, bem como a estreita interação entre os mecanismos inflamatórios envolvidos em ambas as doenças, torna-se relevante a identificação de ferramentas capazes de auxiliar na detecção e no monitoramento das alterações associadas a essa comorbidade. Nesse sentido, a busca por biomarcadores que reflitam os mecanismos inflamatórios compartilhados entre as duas condições pode contribuir para uma abordagem diagnóstica mais precoce e individualizada. Entre as diferentes matrizes biológicas disponíveis, a saliva apresenta características particularmente favoráveis à investigação de biomarcadores, por permitir coleta simples, não invasiva e de fácil repetição. Nesse contexto, a saliva apresenta-se como um fluido biológico acessível e não invasivo, com potencial diagnóstico crescentemente reconhecido tanto para doenças bucais quanto sistêmicas (Zhou & Liu, 2023). Sua composição resulta da contribuição das secreções das glândulas salivares maiores e menores, do fluido gengival e de exsudatos da mucosa oral, além de moléculas de origem sistêmica que podem alcançar a saliva por diferentes mecanismos de transporte.

Essa composição complexa torna a saliva uma matriz de interesse para a identificação de biomarcadores de doenças bucais e sistêmicas (Lorenzo-Pouso et al., 2018; Bostanci et al., 2018). Assim, a identificação de biomarcadores salivares relacionados aos mecanismos inflamatórios compartilhados entre a periodontite e o DM tipo 2 tem despertado crescente interesse, por possibilitar estratégias diagnósticas e de monitoramento menos invasivas. Entre esses biomarcadores, proteínas como a High Mobility Group Box 1 (HMGB1) e a calreticulina têm despertado interesse crescente como mediadores biológicos relevantes na interação entre periodontite e DM tipo 2. O HMGB1 é uma proteína nuclear não-histona, ou seja, proteínas associadas ao DNA que desempenham funções estruturais, regulatórias e enzimáticas no núcleo celular, sem participar da formação dos nucleossomos (Kanzaki et al., 2018). Quando liberada para o meio extracelular em resposta a estímulos inflamatórios ou necrose celular, o HMGB1 atua como potente alarmina pró-inflamatória, interagindo com receptores RAGE e Toll-like receptors (TLR-2 e TLR-4) e ativando vias relacionadas ao NF-κB (Yoshihara-Hirata et al., 2018).

Na periodontite, observa-se aumento da expressão de HMGB1 nos tecidos gengivais e no fluido gengival e evidências experimentais demonstram que sua neutralização reduz a inflamação periodontal e a reabsorção óssea alveolar (Yoshihara-Hirata et al., 2018). Em indivíduos com DM tipo 2, alterações metabólicas associadas à hiperglicemia podem favorecer a ativação da via AGE–RAGE, enquanto a maior expressão de RAGE no tecido gengival pode potencializar a sinalização inflamatória mediada pelo HMGB1, contribuindo para a maior severidade da periodontite associada ao diabetes (Morimoto-Yamashita et al., 2012). A calreticulina é uma proteína chaperona residente no retículo endoplasmático, desempenhando funções canônicas no dobramento de glicoproteínas e na homeostase do cálcio intracelular. Além dessas funções, a calreticulina apresenta atividades extracelulares e imunorregulatórias, participando de processos relacionados à resposta imune e à interação com diferentes componentes celulares (Eggleton & Llewellyn, 1999; Venkatesan et al., 2021). Em determinadas condições de estresse celular, a calreticulina pode ser translocada para a superfície celular ou atuar no meio extracelular, onde exerce funções distintas das observadas no retículo endoplasmático. Adicionalmente, estudos experimentais demonstram que ela apresenta atividade anti-osteoclastogênica, inibindo fatores de transcrição como NFATc1 e c-Fos e reduzindo a reabsorção óssea inflamatória (Fischer et al., 2017). Dado que sua expressão é regulada por hiperglicemia e estresse oxidativo (condições prevalentes tanto na periodontite quanto no DM tipo 2), a calreticulina emerge como um potencial biomarcador e mediador biológico da interação entre essas doenças (Eggleton & Llewellyn, 1999). Além disso, as caspases (CASPs), especialmente CASP-1, -3 e -8, integram a cascata do inflamassoma e têm sido associadas à fisiopatologia de ambas as

condições, sendo sua detecção salivar considerada uma estratégia promissora para monitoramento da atividade inflamatória (Marchesan et al., 2020; Milan et al., 2025).

Estudos recentes têm demonstrado o potencial de biomarcadores salivares relacionados à inflamação e ao inflamassoma para a avaliação do estado periodontal, incluindo HMGB1 e componentes como NLRP3, ASC e caspase-1 (Isaza-Guzmán et al., 2017; Yoshihara-Hirata et al., 2018). Entretanto, o comportamento desses biomarcadores, particularmente HMGB1 e calreticulina na saliva de indivíduos com periodontite associada ao DM tipo 2, permanece pouco explorado, justificando a investigação de seu potencial como indicadores da interação entre essas condições.

Diante do exposto, nossa hipótese é que pacientes com periodontite e DM tipo 2 apresentam níveis salivares elevados de CASP-3, CASP-8, HMGB1 e CRT em comparação a indivíduos saudáveis ou com apenas uma das condições, e que esses biomarcadores podem representar ferramentas auxiliares no diagnóstico e no monitoramento da periodontite nessa população.

Metodologia

Trata-se de um estudo clínico observacional, de delineamento transversal, conduzido de acordo com as recomendações do *Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology* (STROBE). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sob CAAE 19319219.8.0000.5501 e Parecer nº 7.656.202. Foram avaliados 40 indivíduos, com idade superior a 40 anos, distribuídos igualmente em quatro grupos: diabetes mellitus tipo 2 (DM2) associado à periodontite (DP; n=10), DM2 sem periodontite (D; n=10), periodontite sem DM2 (P; n=10) e indivíduos sem DM2 e sem periodontite (S; n=10). Entre os participantes com DM2, o diagnóstico deveria apresentar no mínimo cinco anos de evolução e hemoglobina glicada (HbA1c) entre 7% e 10%. O diagnóstico periodontal foi realizado segundo a classificação de Tonetti et al. (2018), considerando casos de periodontite nos estágios III e IV. Foram excluídos tabagistas e ex-tabagistas com cessação inferior a cinco anos, gestantes, indivíduos submetidos a tratamento periodontal nos 12 meses anteriores, usuários de antibióticos ou anti-inflamatórios nos três meses anteriores e indivíduos com condições sistêmicas capazes de interferir na progressão da doença periodontal. O exame periodontal foi realizado por um único periodontista calibrado, considerando seis sítios por dente, incluindo índice de placa (IP), sangramento à sondagem (SS), profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI). A saliva não estimulada foi coletada pelo método da cuspidela, após jejum de duas horas, durante dez minutos, sendo posteriormente centrifugada e armazenada a −80 °C. As concentrações salivares de caspase-3, caspase-8, HMGB1 e calreticulina foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA), em duplicata, com resultados expressos em pg/mL. Os dados foram analisados no GraphPad Prism 5.01. A normalidade foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e, considerando o caráter exploratório e o tamanho amostral, foram calculados os tamanhos de efeito (ε^2) e o poder estatístico das análises.

Resultados Parciais

Foram avaliados 40 participantes, distribuídos igualmente entre os quatro grupos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto ao sexo ($p > 0,999$), idade ($p = 0,365$), tempo de diagnóstico do DM2 ($p = 0,642$), HbA1c ($p = 0,983$) e volume salivar ($p = 0,282$). Observou-se diferença significativa quanto ao número de dentes ($p = 0,027$), com menor número de dentes no grupo P em comparação ao grupo S. Em relação aos parâmetros periodontais, foram identificadas diferenças significativas entre os grupos para IP ($p < 0,0001$), SS ($p = 0,0009$), PS ($p < 0,0001$) e NCI ($p < 0,0001$), sendo os maiores valores observados nos grupos com periodontite (DP e P). Na análise dos biomarcadores, HMGB1 e calreticulina apresentaram grandes tamanhos de efeito ($\varepsilon^2 = 0,45$ e $0,36$, respectivamente), associados a poder estatístico superior a 95%. Em contraste, caspase-3 e caspase-8 apresentaram pequenos tamanhos de efeito ($\varepsilon^2 = 0,02$ e $0,05$, respectivamente), com poder estatístico inferior a 30%. Os resultados sugerem maior capacidade

discriminatória da amostra para HMGB1 e calreticulina, enquanto as análises de correlação com parâmetros periodontais, curvas ROC e regressão logística permanecem em andamento.

Discussão

Os resultados parciais demonstraram que os grupos apresentaram características sociodemográficas semelhantes, sem diferenças significativas quanto à idade e ao sexo, além de comparabilidade entre os participantes com DM2 quanto ao tempo de diagnóstico e aos níveis de HbA1c. Esses achados são relevantes, pois reduzem a possibilidade de que diferenças nessas características tenham influenciado as comparações entre os grupos. Da mesma forma, a ausência de diferença no volume salivar sugere que as variações observadas nos biomarcadores não estejam relacionadas a diferenças na quantidade de saliva produzida.

A diferença observada no número de dentes entre os grupos, com menor número de dentes no grupo com periodontite sem DM2 em comparação ao grupo sem DM2 e sem periodontite, é compatível com o impacto da doença periodontal avançada sobre a manutenção dos elementos dentários. Além disso, os parâmetros clínicos periodontais apresentaram diferenças significativas entre os grupos, com maiores valores de índice de placa, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e nível clínico de inserção nos grupos com periodontite. Esses resultados demonstram a adequada diferenciação clínica entre os participantes com e sem periodontite e reforçam a caracterização da população estudada.

Entre os biomarcadores avaliados, HMGB1 e calreticulina apresentaram os maiores tamanhos de efeito, indicando maior magnitude de diferença entre os grupos estudados. O elevado poder estatístico observado para ambos (>95%) sugere que, dentro das limitações do tamanho amostral e do caráter exploratório da investigação, esses biomarcadores apresentam maior potencial para discriminar os grupos em comparação às caspases 3 e 8. Em contraste, os pequenos tamanhos de efeito observados para caspase-3 e caspase-8, acompanhados de baixo poder estatístico, indicam que os resultados dessas moléculas devem ser interpretados com cautela, especialmente considerando o número reduzido de participantes.

A identificação de maior efeito para HMGB1 e calreticulina é particularmente relevante para a continuidade da investigação, uma vez que ambos estão relacionados a processos celulares e inflamatórios e podem apresentar potencial como biomarcadores salivares. Entretanto, os resultados disponíveis ainda não permitem estabelecer uma associação definitiva desses biomarcadores com a presença de DM2 ou periodontite. As análises de correlação com os parâmetros clínicos periodontais, bem como as curvas ROC e os modelos de regressão logística, poderão contribuir para esclarecer a relação entre os níveis salivares dos biomarcadores e as condições investigadas.

Conclusão

Os resultados parciais demonstraram diferenças significativas nos parâmetros clínicos periodontais entre os grupos, confirmando a adequada caracterização da condição periodontal da amostra. Entre os biomarcadores avaliados, HMGB1 e calreticulina apresentaram os maiores tamanhos de efeito e elevado poder estatístico, indicando maior potencial para discriminar os grupos estudados. As caspases 3 e 8 apresentaram pequenos tamanhos de efeito e baixo poder estatístico. Dessa forma, os achados preliminares apontam HMGB1 e calreticulina como biomarcadores de maior interesse para a investigação da relação entre periodontite e DM2, devendo esses resultados ser confirmados pelas análises complementares em andamento.

Referências

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2020. Diabetes Care, v. 43, supl. 1, p. S14-S31, 2020. DOI: 10.2337/dc20-S002.

BANDYOPADHYAY, D.; MARLOW, N. M.; FERNANDES, J. K.; LEITE, R. S. Periodontal disease progression and glycaemic control among Gullah African Americans with type-2 diabetes. Journal of Clinical Periodontology, v. 37, n. 6, p. 501-509, 2010. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2010.01564.x.

BARTOLD, P. M.; VAN DYKE, T. E. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. Periodontology 2000, v. 75, n. 1, p. 317-329, 2017. DOI: 10.1111/prd.12169.

BORGNAKKE, W. S.; YLÖSTALO, P. V.; TAYLOR, G. W.; GENCO, R. J. Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence. Journal of Clinical Periodontology, v. 40, supl. 14, p. S135-S152, 2013. DOI: 10.1111/jcpe.12080.

BOSTANCI N, SELEVSEK N, WOLSKI W, GROSSMANN J, BAO K, WAHLANDER A, et al. Targeted proteomics guided by label-free quantitative proteome analysis in saliva reveal transition signatures from health to periodontal disease. Mol Cell Proteomics. 2018;17(7):1392-1409. doi:10.1074/mcp.RA118.000718.

EGGLETON, P.; LLEWELLYN, D. H. Pathophysiological roles of calreticulin in autoimmune disease. Scandinavian Journal of Immunology, v. 49, n. 5, p. 466-473, 1999. DOI: 10.1046/j.1365-3083.1999.00542.x.

EKE, P. I.; LIANG, W.; THORNTON-EVANS, G.; et al. Risk indicators for periodontitis in US adults: NHANES 2009 to 2012. Journal of Periodontology, v. 87, n. 10, p. 1174-1185, 2016. DOI: 10.1902/jop.2016.160013.

FISCHER, C. R.; MIKAMI, M.; MINEMATSU, H.; et al. Calreticulin inhibits inflammation-induced osteoclastogenesis and bone resorption. Journal of Orthopaedic Research, v. 35, n. 12, p. 2658-2666, 2017. DOI: 10.1002/jor.23587.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nature Reviews Immunology, v. 15, n. 1, p. 30-44, 2015. DOI: 10.1038/nri3785.

HAJISHENGALLIS, G.; DIAZ, P. I. Porphyromonas gingivalis: immune subversion activities and role in periodontal dysbiosis. Current Oral Health Reports, v. 7, n. 1, p. 12-21, 2020. DOI: 10.1007/s40496-020-00249-3.

ISAZA-GUZMÁN, D. M.; MEDINA-PIEDRAHÍTA, V. M.; GUTIÉRREZ-HENAO, C.; TOBÓN-ARROYAVE, S. I. Salivary levels of NLRP3 inflammasome-related proteins as potential biomarkers of periodontal clinical status. Journal of Periodontology, v. 88, p. 1329-1338, 2017. DOI: 10.1902/jop.2017.170244.

LALLA, E.; CHENG, B.; LAL, S.; et al. Periodontal changes in children and adolescents with diabetes. Diabetes Care, v. 29, n. 2, p. 295-299, 2006. DOI: 10.2337/diacare.29.02.06.dc05-1355.

LORENZO-POUSO, A. I.; PÉREZ-SAYÁNS, M.; BRAVO, S. B.; et al. Protein-based salivary profiles as novel biomarkers for oral diseases. Disease Markers, v. 2018, p. 6141845, 2018. DOI: 10.1155/2018/6141845.

MARCHESAN, J. T.; GIRNARY, M.; MOSS, K.; et al. Role of inflammasomes in the pathogenesis of periodontal disease and therapeutics. Periodontology 2000, v. 82, n. 1, p. 93-114, 2020. DOI: 10.1111/prd.12269.

MILAN, K. L.; BHATNAGAR, M.; RAMKUMAR, K. M. Role of inflammasomes in diabetes mellitus: mechanisms, complications, and therapeutic potential. Molecular Biology Reports, v. 52, n. 1, p. 621, 2025. DOI: 10.1007/s11033-025-10719-5.

MORIMOTO-YAMASHITA, Y.; ITO, T.; KAWAHARA, K. I.; et al. Periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: is the HMGB1-RAGE axis the missing link? Medical Hypotheses, v. 79, n. 4, p. 452-455, 2012. DOI: 10.1016/j.mehy.2012.06.020.

NIBALI, L.; GKRANIAS, N.; MAINAS, G.; DI PINO, A. Periodontitis and implant complications in diabetes. Periodontology 2000, v. 90, n. 1, p. 88-105, 2022. DOI: 10.1111/prd.12451.

PAPAPANOU, P. N.; SANZ, M.; BUDUNELI, N.; et al. Periodontitis: consensus report of Workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. Journal of Periodontology, v. 89, supl. 1, p. S173-S182, 2018. DOI: 10.1002/JPER.17-0721.

SANZ, M.; CERIELLO, A.; BUYSSCHAERT, M.; et al. Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International Diabetes Federation and the European Federation of Periodontology. Diabetes Research and Clinical Practice, v. 137, p. 231-241, 2018. DOI: 10.1016/j.diabres.2017.12.001.

SIMPSON, T. C.; CLARKSON, J. E.; WORTHINGTON, H. V.; et al. Treatment of periodontitis for glycaemic control in people with diabetes mellitus. Cochrane Database of Systematic Reviews, v. 4, n. 4, CD004714, 2022. DOI: 10.1002/14651858.CD004714.pub4.

TONETTI, M. S.; GREENWELL, H.; KORNMAN, K. S. Staging and grading of periodontitis: framework and proposal of a new classification and case definition. Journal of Periodontology, v. 89, supl. 1, p. S159-S172, 2018. DOI: 10.1002/jper.18-0006.

VENKATESAN, A.; SATIN, L. S.; RAGHAVAN, M. Roles of calreticulin in protein folding, immunity, calcium signaling and cell transformation. Progress in Molecular and Subcellular Biology, v. 59, p. 145-162, 2021. DOI: 10.1007/978-3-030-67696-4_7.

YOSHIHARA-HIRATA, C.; YAMASHIRO, K.; YAMAMOTO, T.; et al. Anti-HMGB1 neutralizing antibody attenuates periodontal inflammation and bone resorption in a murine periodontitis model. Infection and Immunity, v. 86, n. 5, e00111-18, 2018. DOI: 10.1128/IAI.00111-18.

ZHANG, X.; ZHANG, J.; REN, Y.; et al. Unveiling the pathogenesis and therapeutic approaches for diabetic nephropathy: insights from panvascular diseases. Frontiers in Endocrinology, v. 15, p. 1368481, 2024. DOI: 10.3389/fendo.2024.1368481.

ZHOU, Y.; LIU, Z. Saliva biomarkers in oral disease. Clinica Chimica Acta, v. 548, p. 117503, 2023. DOI: 10.1016/j.cca.2023.117503.